

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-006834

(43)Date of publication of application : 12.01.1999

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

G01N 21/27

G01N 27/327

(21)Application number : 09-176540

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEM CORP

(22)Date of filing : 17.06.1997

(72)Inventor : KAWAI KUNJI
HAYASE TETSUO

(54) SENSOR CHIP FOR BIOSENSOR, BIOSENSOR AND MANUFACTURE THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a sensor chip for a biosensor, the biosensor using the sensor chip and a method for manufacturing of the biosensor whereby a material required for the manufacturing can be readily obtained and ligands (molecule discrimination elements) can be fixed with high density.

SOLUTION: A self-organizing single molecule film layer made from straight hydrophobic molecules having a functional group connectable to a metallic thin film at one end is formed on the metallic thin film of a light-permeable carrier body as a first layer. A plane single molecule film layer made from amphipathic molecules wherein a hydrophobic part is oriented on the self-organizing single molecule film layer is provided to the surface of the first layer as a second layer for chemical connection with ligands (molecule discrimination elements). Thus, there are provided a sensor chip for a biosensor, the biosensor for surface plasmon resonance constituted such that the ligands are chemically connected to the surface of the sensor chip and a method for manufacturing of the biosensor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Japanese Unexamined Patent Publication
No. 6834/1999 (*Tokukaihei 11-6834*)

A. Relevance of the Above-identified Document

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See also the attached English Abstract.

[CLAIMS]

[CLAIM 1]

A sensor chip for use in a biosensor, ...

the sensor chip comprising:

a light-transmitting carrier body having a metallic thin film formed on one side of the light-transmitting carrier body;

a self-organizing monomolecular film layer, as a first layer, being provided on the metallic thin film and made from straight hydrophobic molecules having a functional group connectable to the metallic thin film at one end; and

a plane monomolecular film layer, as a second layer for chemical bonding with ligands (molecule recognition elements), being provided on a surface of the first layer

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and made from amphipathic molecules wherein a hydrophobic part is oriented on the self-organizing monomolecular film layer.

[0017]

The light-transmitting carrier body is usually constituted by optical glass. The metallic thin film formed on one side of the light-transmitting carrier body is most desirably a gold thin film. However, the metallic thin film may be a thin film of silver or copper.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-6834

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月12日

(51) IntCl ⁶	識別記号	FI	
G 0 1 N 33/543	5 9 5	G 0 1 N 33/543	5 9 5
21/27		21/27	C
27/327		27/30	3 5 7

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平9-176540

(22) 出願日 平成9年(1997) 6月17日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 河合 龍二

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(72) 発明者 早瀬 哲郎

神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

三菱化学株式会社横浜総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 岡田 数彦

(54) 【発明の名称】 バイオセンサー用センサーチップ及びバイオセンサー並びにその製作方法

(57) 【要約】

【課題】製作に必要な物質が容易に入手可能であり、そして、リガンド（分子識別素子）を高密度に固定し得るバイオセンサー用センサーチップ及び当該チップを使用したバイオセンサー並びにその製作方法を提供する。

【解決手段】片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、リガンド（分子識別素子）を化学結合するための第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設けて成るバイオセンサー用センサーチップ及び当該センサーチップ表面にリガンドを化学結合して成る表面プラズモン共鳴用バイオセンサー並びにその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 センサーチップの表面にリガンド（分子識別素子）を固定化して成る表面プラズモン共鳴用バイオセンサーにおける上記のセンサーチップであって、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、リガンド（分子識別素子）を化学結合するための第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設けて成ることを特徴とするバイオセンサー用センサーチップ。

【請求項2】 両親媒性分子の親水性官能基が活性化された官能基である請求項1記載のバイオセンサーチップ。

【請求項3】 両親媒性分子の親水性官能基が1分子内に2個以上の同種類または異種類の官能基を有する請求項1又は2記載のバイオセンサーチップ。

【請求項4】 平面単分子膜層が2種類以上の両親媒性分子から構成されている請求項1～3の何れかに記載のバイオセンサーチップ。

【請求項5】 片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設け、その表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合して成ることを特徴とする表面プラズモン共鳴用バイオセンサー。

【請求項6】 被識別分子が高分子である請求項5に記載のバイオセンサー。

【請求項7】 高分子が生体高分子である請求項6に記載のバイオセンサー。

【請求項8】 センサーチップの表面にリガンド（分子識別素子）を固定化する表面プラズモン共鳴用バイオセンサーの製作方法において、センサーチップとして、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設けて成るセンサーチップを使用し、そして、第二層の表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合することを特徴とするバイオセンサーの製作方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、バイオセンサー用センサーチップ及びバイオセンサー並びにその製作方法

に関し、詳しくは、リガンド（分子識別素子）を高密度に固定し得るバイオセンサー用センサーチップ及び当該チップを使用したバイオセンサー並びにその製作方法に関する。本発明のバイオセンサーは、特に、生体高分子などの高分子の測定に好適である。

【0002】

【従来の技術】 表面プラズモン共鳴センサー（SPRセンサー）は、生体高分子間における相互作用の検出に使用される。この場合、センサーチップ表面にリガンド（分子識別素子）としての生体高分子の一方を固定化し、他方の生体高分子をセンサーに作用させ、その結果現れる測定シグナルを調べる。そして、固定化生体高分子が多い場合、後続の生体高分子間の相互作用の検出度を高めることが出来るため、センサーチップに多くの生体高分子を固定化したバイオセンサーが要求される。

【0003】 センサーチップには次の3点が要求される。

（1）表面に高密度に生体高分子を固定化できる。
（2）非特異吸着効果がなく、また、あっても非常に小さい。
（3）製作に必要な物質が容易に入手可能であり且つ安価である。

【0004】 一方、SPRセンサーチップにリガンドを固定する方法（すなわち、センサーの製作方法）としては以下の報告がある。国際公開W090/05303号公報には、上記（1）及び（2）の条件を満足するチップとして、金の膜上にマトリックスとしてヒドロゲルを結合し、当該ヒドロゲルの官能基にリガンドを結合させた単層構造のチップが示されている。斯かるチップは、リガンドとして免疫グロブリンG、キモトリブシノーゲンA又はトランスフェリンを使用した場合、50 ng/mm²までの密度で固定化することが出来る。

【0005】 E.Kalb等は、ガラス表面にリン脂質の親水基部分を吸着させて単分子膜層（Supported phospholipid monolayer）を得、当該単分子膜層の表面にリン脂質ベシクルを融合させることにより、二層構造（Supported planar bilayer）が得られることを報告している（Biochimica et Biophysica Acta 1992, 1103, 307-316）。

【0006】 A.L.Plant等は、金表面にオクタデカンチオール（Self-assembled monolayer: SAM）とリン脂質の単分子膜層から成る二層構造が形成されることを報告している（Langmuir 1993, 9, 2464-2767）。

【0007】 E.Torchut等は、ガラス表面に形成されたオクタデシルトリクロロシラン疎水性表面にリン脂質の単分子膜層が形成されることを報告している（Biophysical Journal 1994, 66, 753-762）。

【0008】 国際公開W096/10178号公報は、金表面に形成した11-ヒドロキシウンデカンチオール親水性表面にミセル又はベシクルを融合させることにより、脂質二分子膜層（supported phospholipid bilayer）が形成さ

れることを報告している。しかしながら、11-ヒドロキシウンデカンチオールは、容易に入手可能であるが高価であり、チップとしての上記条件を満たしていない。

【0009】以上の報告から明らかなことは、一番目に形成させる膜層の疎水性度の正逆の違いにより、その次に積層する脂質分子層数が異なるということである。また、リガンドの固定化密度は十分でない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記実情に鑑みなされたものであり、その目的は、製作に必要な物質が容易に入手可能であり、そして、リガンド（分子識別素子）を高密度に固定し得るバイオセンサー用センサーチップ及び当該チップを使用したバイオセンサー並びにその製作方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明の第1の要旨は、センサーチップの表面にリガンド（分子識別素子）を固定化して成る表面プラズモン共鳴用バイオセンサーにおける上記のセンサーチップであって、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、リガンド（分子識別素子）を化学結合するための第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設けて成ることを特徴とするバイオセンサー用センサーチップに存する。

【0012】本発明の第2の要旨は、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設け、その表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合して成ることを特徴とする表面プラズモン共鳴用バイオセンサーに存する。

【0013】本発明の第3の要旨は、センサーチップの表面にリガンド（分子識別素子）を固定化する表面プラズモン共鳴用バイオセンサーの製作方法において、センサーチップとして、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体の当該金属薄膜上に、第一層として、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成された自己組織化単分子膜層を設け、その表面に、第二層として、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成された平面単分子膜層を設けて成るセンサーチップを使用し、そして、第二層の表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合することを特徴とするバイオセンサーの製作方法に存する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。先ず、本発明におけるセンサーチップについて説明する。本発明のセンサーチップは、片面に金属薄膜を形成した光透過性担体、自己組織化単分子膜層および平面単分子膜層から構成される。そして、自己組織化単分子膜層は、一方の末端に上記の金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成され、平面単分子膜層は、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向した両親媒性分子から形成される。

【0015】上記の構造それ自体は、前述の通り、A.L. Plant等によって提案されている。しかしながら、特に、生体高分子などの高分子の測定のため、すなわち、リガンド（分子識別素子）としての生体高分子を固定化するためのチップとして上記の構造を利用する提案はなされていない。

【0016】本発明の特徴は、上記の構造における平面単分子膜層の水平方向の流動性を巧みに利用することによって完成されたものである。すなわち、本発明は、上記の流動性によりリガンドの結合点となる官能基間における立体障害が回避され、従来に比し、高密度にリガンドを固定し得るとの新規な知見に基づくものである。要するに、本発明のセンサーチップは、その表面にリガンド（分子識別素子）を固定化して成る表面プラズモン共鳴用バイオセンサーにおいて使用されるセンサーチップである。

【0017】前記の光透過性担体は、通常、光学ガラスで構成される。光透過性担体の片面に形成する金属薄膜は、金薄膜が最適である。しかし、銀または銅の薄膜であってよい。

【0018】前記の自己組織化単分子膜層は、一方の末端に金属薄膜に結合し得る官能基を有する直線状疎水性分子から形成されている。斯かる直線状疎水性分子における直線状疎水性部分は、通常3～30の炭素原子の飽和炭化水素鎖、好ましくは11～18の炭素原子の飽和炭化水素鎖とされる。一方、官能基としては、硫黄原子を含有する基、例えば、メルカプト基などが挙げられる。直線状疎水性分子の具体例としては、16-ヘキサデカンチオール、18-オクタデカンチオール等が挙げられる。直線状疎水性分子は、その官能基により、各分子が並列に配置された状態で金属薄膜に固定され、第一層としての自己組織化単分子膜層を形成している。

【0019】前記の平面単分子膜層は両親媒性分子から成る。両親媒性分子としては、例えば、リン脂質が挙げられる。リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジバルミトイルホスファチジルセリン、ジバルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン等が挙げられる。

【0020】上記両親媒性分子は、1分子内に2個以上の同種類または異種類の親水性官能基を有することが出来る。また、上記の平面単分子膜層は、2種類以上の両親媒性分子から構成されていてもよい。両親媒性分子は、自己組織化単分子膜層に疎水性部分を配向して配列され、第二層としての平面単分子膜層を形成している。そして、この第二層は、その表面にリガンド（分子識別素子）を化学結合するための層として利用される。

【0021】上記のリガンド（分子識別素子）としては、バイオセンサーによって測定される被識別分子の種類により適宜選択されるが、その一例としては、タンパク質、糖類、酵素、抗原、抗体などが挙げられる。なお、被識別分子の好適な例としては、生体高分子を初めとする各種の高分子が挙げられる。

【0022】次に、本発明に係るバイオセンサーの製作方法について説明する。本発明の製作方法は、センサーチップの表面にリガンド（分子識別素子）を固定化することから成る表面プラズモン共鳴用バイオセンサーの製作方法である。そして、その特徴は、前述のセンサーチップを使用し、第二層の表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合する点にある。

【0023】上記の化学結合は、両親媒性分子で形成される平面単分子膜層の官能基と親和性を有するリガンドとの間で行われる。上記の官能基としては、カルボキシル基、アミノ基、水酸基、アルデヒド基、メルカプト基、エポキシ基、ビオチノイル基などが挙げられる。リガンドとの固定化密度を向上させるため、上記の官能基は、活性化してもよく、また、スパーサーとして各種アミノ酸などの親水性化合物を導入してもよい。上記の親水性スパーサーに対するリガンドの固定は、親水性スパーサーの活性化後に行なってもよい。

【0024】本発明のバイオセンサーは、上記の様に製作され、そして、前述のセンサーチップの第二層の表面に、第三層として、リガンド（分子識別素子）を化学結合して成ることを特徴とする。斯かる本発明のバイオセンサーは、リガンド（分子識別素子）が高密度に固定されており、特に、生体高分子などの高分子の測定に好適である。

【0025】

【実施例】以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例には限定されない。

【0026】（1）自己組織化単分子膜層の形成：内径5cmの蓋付きシャーレ中に金蒸着ガラスを入れた。この金蒸着ガラスの金薄膜表面に18-オクタデカンチオールのエタノール溶液（5mM）30mlを注ぎ、24時間放置した。その後、30mlのクロロホルムで5回、30mlのエタノールで5回の洗浄処理を行い、乾燥窒素気流下で乾燥処理した。乾燥後の金薄膜表面の接触角は110°であり、金薄膜表面は疎水化されていた。

【0027】（2）平面単分子膜層の形成：ブローブ型超音波破砕機にジバルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）の1mM溶液HEPESバッファー（HBS）（10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mMEDTA、pH7.4）の10mlを供し、溶液全体を透明にした。そして、内径3cmのガラス製蓋付きシャーレ中に上記の（1）で得られた金蒸着ガラスを入れ、その金薄膜表面に上記で得られた溶液を流し、室温下、24時間放置した。その後、SPRセンサー（日本レーザー電子社製）に金蒸着ガラスを装着した。

【0028】上記のSPRセンサーは、ランニングバッファーとしてHBSを使用し、シグナルをリアルタイムで観測した。ベースラインが安定した後、200mMのN-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの塩酸塩（EDC）及び50mM N-ヒドロキシコハク酸イミド（NHS）の混合水溶液（EDC+NHS）5mlをセンサーチップ表面に作用させてカルボキシル基を活性化した。HBSで置換してベースラインを安定させた後、100mMのγ-カルボキシグルタミン酸（gla）の水溶液7.5mlを注入した。

【0029】（3）リガンド蛋白質の固定化：本発明の効果（リガンドの固定化密度の向上）を確認するため、リガンド蛋白質として便宜上、牛血清アルブミン（BSA）を使用した。先ず、上記の（2）操作後、EDC+NHS 5mlを注入して、表面カルボキシル基を活性化した。HBS置換によりベースラインが安定した際のSPRシグナル強度（ θ_1 ）を測定した。その後、センサーチップ表面に1mg/mlのBSA 7.5mlを注入した。注入後に再びSPRシグナル強度（ θ_2 ）を測定した。BSAが固定化されたことによるシグナル強度の変量 θ （ $=\theta_2-\theta_1$ ）を評価した。BSA固定化によって1.8°のシグナル変化が認められた。

【0030】（4）非特異吸着効果の評価：上記の（2）の操作で得たセンサーチップ表面に、EDC+NHSによる活性を行わず、上記と同濃度で同量のBSAを注入した。HBSで置換した際のシグナル強度変量を測定した。その結果、シグナル強度は、0.01°程度の変化であり、殆ど変化しないことが分かった。上記のことから、センサーチップ表面への非特異吸着は、殆ど無いと言える。

【0031】（5）リガンドの最大固定化密度：以上の実験でセンサーチップ表面に固定化されるリガンドの最大固定化密度を測定するため、上記（2）の実験と同様の操作で固定化したBSAをアミノ酸分析法により評価した。評価の結果、120ng/mm²までBSAを固定化できることが分かった。また、対照実験として、BIAcore用センサーチップ（ファルマシア社製「CM-5」）を使用して同様の実験を行った結果、50ng/mm²の密度まで固定化できることが分かった。

【0032】（6）平面単分子膜層の流動性がリガンド

の固定化密度へ与える影響：3-メルカプトプロピオン酸から成る自己組織化単分子膜層の末端カルボキシル基にqlaを結合させた。上記の膜層表面に蛋白質を固定化し、その固定化密度を測定した。測定の結果、30 ng/m²の固定化が出来た。上記のことから明らかなことは、両親媒性分子から構成された平面単分子膜層が水平方向に流動性を有するため、リガンドの結合点となる官能基間での立体障害が回避され、結果的にリガンドの固

定化密度が上昇していることである。

【0033】

【発明の効果】以上説明した本発明のSPRセンサーチップは、安価に製作でき、しかも、リガンドを特異的に高密度に固定化することが出来る。従って、本発明のSPRセンサーチップは、SPRバイオセンサー用として有用である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)